

UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT UNE FORME SOLUBLE D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DU SANG.

La présente invention est relative à l'utilisation de compositions contenant une forme soluble d'HLA-G dans le traitement de pathologies du sang et du système circulatoire (anémies et ischémies).

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), et dont le domaine $\alpha 3$ est associé à la $\beta 2$ microglobuline, les antigènes de classe II (HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précisée, ce gène comprend 8 exons, 7 introns et une extrémité non traduite 3' ; les 8 exons correspondent respectivement à : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine extracellulaire $\alpha 1$, exon 3 : domaine extracellulaire $\alpha 2$, exon 4 : domaine extracellulaire $\alpha 3$, exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II (non traduit), exon 8 : domaine cytoplasmique III (non traduit) et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia* Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Toutefois, le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta et sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du fœtus (absence de rejet par la mère). En outre, dans la mesure où

l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I
5 (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcript primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcript primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 pb, un fragment de 900 pb (G2) et un fragment de 600 pb (G3).

10 Le transcript G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code une protéine qui comprend une séquence signal, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont directement joints ;
15 l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 1$ et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant $\alpha 1$) avec une séquence AC (issue du domaine codant $\alpha 3$), ce qui entraîne la création d'un codon
20 AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant le domaine $\alpha 3$ dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.
25

Les Auteurs de cet article concluent à un rôle fondamental de la molécule HLA-G dans la protection du fœtus vis-à-vis d'une réponse immune maternelle (induction d'une tolérance immunitaire). Certains des Inventeurs ont confirmé ce rôle : les molécules HLA-G, exprimées à la surface des trophoblastes protègent effectivement les cellules fœtales de la lyse par les cellules *natural killer* (NK)
30

maternelles (CAROSELLA E.D. et al., C.R. Acad. Sci., 318, 827-830 ; CAROSELLA E.D. et al ; *Immunol. Today*, 1996, 407-409).

En outre, certains des Inventeurs ont montré l'existence d'autres formes épissées d'ARNm d'HLA-G : le transcrit HLA-G4, qui n'inclut pas l'exon 4 ; le transcrit HLA-G5, qui inclut l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; le transcrit HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213 ; Demande Européenne EP 0 677 582 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, 43, 237-241 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, 43, 231-236) ; et le transcrit HLA-G7 qui inclut l'intron 2, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et l'apparition d'un codon stop après l'acide aminé 2 de l'intron 2 ; ils ont également montré que ces différents transcrits sont exprimés dans plusieurs types de cellules humaines fœtales et adultes, notamment dans les lymphocytes (KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, précité ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, précité).

Il existe donc au moins 7 ARNms HLA-G différents qui codent potentiellement 7 isoformes d'HLA-G dont 4 membranaires (HLA-G1, G2, G3 et G4) et 3 solubles (HLA-G5, G6 et G7).

La distribution de l'antigène HLA-G est restreinte à des sites immuns privilégiés et notamment à l'interface foeto-maternelle.

Il est maintenant bien établi que la protéine HLA-G1, liée à la membrane est principalement exprimée par les cellules du cytotrophoblaste extravilleux dans lesquelles elle protège le fœtus des cellules immunes d'origine maternelle. Aussi bien les isoformes liées à la membrane que les isoformes solubles sont immunotolérantes, à savoir qu'elles inhibent la cytolysé médiée par les cellules NK et les CTL ainsi que la réponse T alloproliférative ; en outre, elles induisent une apoptose dans les cellules T et les cellules NK CD8⁺.

Ainsi la protéine HLA-G exerce sa fonction localement, aussi bien lorsqu'elle est exprimée à la surface des cellules que lorsqu'elle est sécrétée (action à

distance) ; elle assure ainsi l'immunosurveillance de l'organisme (Teyssier Em. Et al., Nat. Immunol., 1995, 14, 262-270).

Des études antérieures ont montré que l'expression des molécules HLA-G à la surface de cellules cibles obtenues par transfection avec des vecteurs comprenant l'ADN génomique de HLA-G, générant potentiellement tous les transcrits alternatifs, permet de protéger lesdites cellules cibles de l'activité lytique des cellules NK de la couche déciduale de l'endomètre maternel (CHUMBLEY G. et al., *Cell Immunol.*, 1994, 155, 312-322 ; DENIZ G. et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4255-4261).

Les Inventeurs, poursuivant leurs travaux ont montré que certaines tumeurs solides exprimaient l'antigène HLA-G, que selon les lignées tumorales, le profil d'expression des isoformes d'HLA-G membranaires et solubles était différent et que la présence des formes membranaires HLA-G1-G4 protégeait les cellules tumorales de la lyse induite par les cellules NK (Demande FR 2 775 294).

En outre, certains des Inventeurs ont montré l'intérêt des formes solubles d'HLA-G dans le traitement des états pathologiques inflammatoires de la peau (Demande Internationale PCT WO 00/78337).

La Demandereuse a maintenant trouvé, de manière surprenante, d'autres localisations des formes solubles d'HLA-G. En particulier, ces isoformes solubles d'HLA-G sont présentes dans les cellules érythroïdes des vaisseaux placentaires du 1^{er} trimestre de la grossesse ainsi qu'au cours de la vascularisation précoce de l'embryon et pendant toute l'érythropoïèse.

Ainsi, de manière surprenante, les Inventeurs ont montré que les isoformes solubles d'HLA-G exercent également des fonctions non-immunologiques.

C'est donc un but de l'invention de pourvoir à de nouvelles applications des isoformes solubles d'HLA-G, directement liées à leurs fonctions non-immunologiques, en particulier dans les pathologies de la circulation sanguine telles que l'anémie ou l'ischémie.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins une isoforme soluble d'HLA-G et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies de la circulation du sang.

Au sens de la présente invention, on entend par pathologies de la circulation du sang aussi bien les pathologies du sang que les pathologies du système circulatoire (moyens de circulation).

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ladite 5 pathologie est sélectionnée dans le groupe constitué par les anémies et les ischémies.

En effet, les Inventeurs ont montré l'intérêt des isoformes solubles d'HLA-G :

1. dans la prolifération, la différenciation et la maturation des érythroblastes en réticulocytes.

10 L'apport d'HLA-G peut stimuler la maturation des érythroblastes circulants, que l'on peut observer dans certaines des pathologies du système circulatoire (K. V. Wagner et al., Development, 2000, 127, 4949-4958 ; M. Ogawa et al., Blood, 1997, 50, 6, 1081-1092) et

2. dans la néo-vascularisation (processus angiogénique).

15 Conformément à l'invention, lesdites compositions se présentent sous l'une des formes suivantes :

- forme liquide, adaptée à une administration parentérale ou orale,
- forme solide, adaptée à une administration parentérale après mise en solution ou en suspension, ou à une administration orale.

20 Les excipients adaptés à ces deux formes sont de préférence : eau, NaCl, dextrose, glycérol, éthanol ou une combinaison de ces produits. D'autres substances telles que des agents mouillants, des agents émulsifiants ou des tampons peuvent avantageusement être ajoutés.

La présente invention a également pour objet un procédé de 25 détection et éventuellement de tri de cellules à fonction non-immunologique exprimant une isoforme soluble d'HLA-G (cellules des lignées érythrocytaires et endothéliales) dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(a) la mise en contact de l'échantillon biologique à tester, avec un 30 panel d'anticorps sélectionné dans le groupe constitué par des anticorps dirigés contre les marqueurs suivants : isoforme soluble d'HLA-G, CD71, CD34 et CD45, et

(b) la détection et éventuellement le tri de cellules correspondant à différents stades de différenciation des lignées érythrocytaires ou endothéliales, en fonction de leur profil d'expression des marqueurs définis en (a).

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il
5 comprend :

(a) la mise en contact de l'échantillon biologique à tester, avec un panel d'anticorps sélectionné dans le groupe constitué par des anticorps dirigés contre les marqueurs suivants : isoforme soluble d'HLA-G, CD71, CD34 et CD45,

(a') la sélection des cellules exprimant l'isoforme soluble d'HLA-G

10 et

(b) la détection du type de cellules à l'aide du marqueur CD71.

En effet, on peut distinguer les cellules endothéliales exprimant HLA-G et les cellules de la lignée érythroïde exprimant HLA-G, par le fait que uniquement ces dernières expriment le marqueur CD71.

15 Conformément à l'invention l'échantillon biologique est avantageusement : un échantillon de sang (détection de cellules de la lignée érythroïde circulantes) ou un échantillon de moelle osseuse.

Définitions

- Hématopoïèse primitive : dans la vésicule vitelline, dans les
20 premiers stades du développement ; reconstitution érythromyéloïde à court terme.

- Production de cellules souches hématopoïétiques (CSH) : la région intra-embryonnaire splanchnopleura para-aortique/aorte-gonade-mésonéphros (P-Sp/AGM) produit les CSH, correspondant aux précurseurs multipotents et capables d'auto-renouvellement qui vont ensuite coloniser le foie foetal et le thymus.

25 - Hématopoïèse définitive : commence dans la moelle osseuse à partir du second trimestre de la vie intra-embryonnaire et continue pendant toute la vie adulte.

- Cellules érythroïdes : premières cellules hématopoïétiques à apparaître au cours de la vie intraembryonnaire, qui donneront naissance aux globules
30 rouges matures.

- Vésicule vitelline (*yolk sac*) : îlots de sang qui apparaissent dans la vésicule vitelline sous la forme de groupes de cellules entre 15 et 24 jours de

développement de l'embryon et qui se différencient en cellules endothéliales à partir des cellules externes des amas (*clusters*) et en cellules hématopoïétiques à partir des cellules internes.

- Hémangioblaste : précurseur commun des cellules endothéliales et
5 des cellules hématopoïétiques présent dans la vésicule vitelline.

- Organes hématopoïétiques primaires : foie embryonnaire, moelle osseuse fœtale.

- Vaisseaux bourgeonnants : dans les villosités chorioniques et la partie juxta-allantoïdienne de la vésicule vitelline.

10 Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, préalablement à l'étape a), les cellules dudit échantillon biologique sont perméabilisées ; cette étape permet aux anticorps d'accéder effectivement aux marqueurs à détecter, qui sont sécrétés dans le cytoplasme, avant leur passage dans la circulation générale (cas des isoformes solubles d'HLA-G).

Ainsi, on obtient des profils de distribution caractéristiques de cellules, comme illustré ci-après :

Cellules/marqueurs	CD71	CD34	HLA-G	CD45
Ligné érythroïde : (embryon, enfant et sujet adulte)				
CSH	-	+	-	+
BFU-E	+	+	+	-
CFU-E	+	-	+	-
Érythroblastes	+	-	+	-
Réticulocytes	+	-	+	-
Erythrocytes matures	-	-	-	-
Cellules endothéliales :	-	+	-	-
- Cellules souches endothéliales	-	+	+	-
- Cellules endothéliales des vaisseaux bourgeonnants (embryon)	-	+	-	-
- Cellules endothéliales des vaisseaux matures				

5

En résumé :

- l'isoforme soluble d'HLA-G est exprimée dans l'ensemble des cellules de la lignée érythroïde et dans tous les organes hématopoïétiques, de l'embryon à l'adulte, alors que l'on ne la retrouve pas dans les érythrocytes matures. En outre on n'observe pas d'expression d'une isoforme soluble d'HLA-G dans les 10 cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34⁺ CD45⁺; ceci implique que l'isoforme soluble d'HLA-G n'a aucune action sur les cellules souches multipotentes.

On peut également noter que l'isoforme soluble d'HLA-G est produite *in vitro* lors de la différenciation de la lignée érythroïde, quel que soit le stade

de maturation. Ces résultats confirment que l'isoforme soluble d'HLA-G est impliquée dans la prolifération et/ou la maturation des précurseurs de la lignée érythroïde.

- l'isoforme soluble d'HLA-G est exprimée dans les cellules endothéliales à un stade précoce chez l'embryon, alors que l'on ne la retrouve pas dans les cellules endothéliales des vaisseaux matures. En particulier, elle est détectée dans les vaisseaux bourgeonnants des villosités chorioniques et de la partie juxta-allantoïdienne de la vésicule vitelline.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la spécificité de l'anticorps 5A6G7 vis-à-vis des formes solubles d'HLA-G. La figure 1A illustre les résultats obtenus par *Western blot*. La spécificité de l'anticorps 5A6G7 a été testée sur les lignées M8-pcDNA, M8-HLA-G1, M8-HLA-G5 et M8-HLA-G6 ; en parallèle, l'anticorps 4H84 (McMaster et al., J. immunol., 1998 et Paul et al., Hum. Immunol., 2000) a été utilisé : l'anticorps 4H84 révèle 3 bandes correspondant à HLA-G1, HLA-G5, et HLA-G6 ; l'anticorps 5A6G7 révèle 2 bandes correspondant à HLA-G5 et HLA-G6. La lignée M8-pcDNA, n'exprimant pas HLA-G, n'est marquée ni par l'anticorps 4H84 ni par l'anticorps 5A6G7. La figure 1B montre les résultats obtenus par immunocytochimie. La spécificité de l'anticorps 5A6G7 a été testée sur les lignées M8-pcDNA, M8-HLA-G1, et M8-HLA-G5, en parallèle avec l'anticorps 4H84 et un contrôle isotypique. Les marquages positifs sont caractérisés par une couleur grisée. Pour chacune des trois lignées l'anticorps utilisé pour les marquages est indiqué en haut. **ligne 1** : la lignée M8-pcDNA, n'exprimant pas HLA-G, n'est marquée ni par l'anticorps 4H84, ni par l'anticorps 5A6G7. **ligne 2** : la lignée M8-HLA-G1 qui ne possède pas l'épitope reconnu par l'anticorps 5A6G7 n'est marquée que par l'anticorps 4H84. **ligne 3** : la lignée M8-HLA-G5 est marquée par les deux anticorps 4H84 et 5A6G7. (grossissement x40). La figure 1C illustre les résultats obtenus par immunofluorescence analysée en microscopie confocale. La spécificité de l'anticorps 5A6G7 a été testée sur les lignées M8-pcDNA, M8-HLA-G1, M8-HLA-G5, FO et

FO-HLA-G6. Comme attendu, les cellules M8-HLA-G5, et FO-HLA-G6 sont marquées par l'anticorps 5A6G7B12 ; alors que les cellules M8-pcDNA, M8-HLA-G1 et FO qui ne possèdent pas l'épitope reconnu par l'anticorps 5A6G7 ne sont pas marqués. L'anticorps 4H84 est un anticorps de référence reconnaissant spécifiquement toutes les isoformes HLA-G.

- la figure 2 illustre la présence des isoformes solubles HLA-G5 et G6 dans les érythroblastes des trophoblastes du premier trimestre de la grossesse. a : expression des isoformes solubles par les îlots cytotrophoblastiques (*cell island trophoblast* ou CIT) mais pas par les PVT (trophoblaste périvilleux), déterminée par analyse immunohistochimique en utilisant l'anticorps 5A6G7 sur des sections de trophoblastes incluses dans de la paraffine ; b : analyse de l'expression des marqueurs suivants : HLA-G5/6, CD34, CD71 et CD45 sur les vaisseaux en développement, présents dans le trophoblaste du premier trimestre par immunohistochimie ; c : coloration immunohistochimique d'un vaisseau différencié à partir de sections de trophoblaste d'un embryon de 32 jours avec des anticorps dirigés contre HLA-G5/G6 (5A6G7), CD34 (qui marque les cellules endothéliales (ED) des vaisseaux, CD71 qui identifie les cellules érythroïdes (ER) et CD45 qui cible à la fois les cellules myéloïdes et les cellules lymphoïdes.

- la figure 3 illustre le fait qu'HLA-G5 est présent dans les cellules érythroïdes du foie fœtal : a : identification de l'isoforme soluble HLAG5 par passage des protéines totales extraites de deux foies fœtaux (9 semaines et 12 semaines) sur un gel SDS-PAGE, suivi d'une immunoempreinte (immunoblotting) avec l'anticorps 5A6G7. Les cellules M8 transfectées avec l'ADN d'HLAG-5 (M8-HLA-G5) ou avec le vecteur contrôle seul (M8-pcDNA) sont utilisées respectivement comme contrôles positif et négatif ; b : analyse immunohistochimique d'un foie d'embryon de 32 jours avec les anticorps dirigés contre : HLA-G5 ; CD34 et CD 45. HLA-G5 est détectée dans les cellules érythroïdes qui proviennent de la vésicule vitelline et sont présents dans la lumière des sinusoides (capillaires de l'embryon). Les cellules endothéliales sont CD45+. Quelques cellules associées aux hépatocytes sont CD34⁺ et CD45⁺ et peuvent être considérées comme les premières cellules progénitrices en provenance de l'AGM.

- la figure 4 illustre le stade de l'embryon, du fœtus des enfants et des adultes analysés par immunohistochimie.

Exemple 1 : Production d'un anticorps monoclonal dénommé 5A6G7, dirigé spécifiquement contre les isoformes solubles d'HLA-G

5

1.1 Obtention d'ascites

L'anticorps monoclonal 5A6G7 est produit en utilisant des protocoles classiques à partir de splénocytes de souris Balb/c immunisées par un peptide de 21-mer synthétique correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles d'HLA-G, dont la séquence est :
10 SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL (SEQ ID NO : 1), couplé à la protéine porteuse ovalbumine (OVA).

1.2 Phase de purification de l'anticorps monoclonal 5A6G7
L'anticorps monoclonal 5A6G7 est purifié à partir d'ascites en utilisant la chromatographie d'affinité à la protéine A-Sépharose et peut à la fois servir à la détection, la titration, et la purification des formes solubles d'HLA-G.
15

1.3 Test de spécificité pour les HLA-G5 et HLA-G6 solubles

Les critères requis pour obtenir un anticorps ayant une bonne spécificité sont les suivants :

- détection des protéines de 37 kDa HLA-G5 et de 28 kDa HLA-G6
20 mais pas des autres isoformes HLA-G et des autres molécules de HLA de classe I présentes dans les lysats de protéines à partir de cellules M8 (cellules issues de la lignée cellulaire de mélanome M8) transfectées respectivement par le vecteur pcDNA seul, des ADNC de HLA-G1, -G2, -G3, -G4, -G5, ou -G6 ; M8-pcDNA, M8-HLA-G1, M8-HLA-G5 et M8-HLA-G6 sont des cellules issues de la lignée cellulaire de mélanome M8, transfectée avec le vecteur vide, HLA-G1, HLA-G5, ou HLA-G6,
25 respectivement. FO et FO-HLA-G6 sont des cellules issues de la lignée cellulaire de mélanome FO, transfectée par le vecteur vide ou HLA-G6, respectivement.

- aucune détection des protéines HLA-A, -B, -C et -E par analyse de type *Western-blot* (immunoempreinte) des lysats de protéines à partir de lignées cellulaires humaines exprimant des types HLA de classe 1 différents ;
30

- immunoprécipitation de la protéine HLA-G5 de 37 kDa à partir de surnageant cellulaire de M8-HLA-G5 ;

- coloration immunocytochimique spécifique des cellules M8-HLA-G5 et M8-HLA-G6 mais pas des autres cellules transfectées par M8-pcDNA, -HLA-G1, -G3, et -G4, ni par des cellules mononucléaires du sang périphérique provenant de plusieurs donneurs adultes en bonne santé exprimant des types de HLA de classe I distincts ;

- coloration immunohistochimique de sections tissulaires de trophoblastes inclus dans de la paraffine mais pas des coupes tissulaires d'adulte normal inclus dans de la paraffine (c'est-à-dire peau, foie, rein, duodénum). Cet anticorps monoclonal permet notamment de discriminer entre les protéines HLA-G solubles générées par décrochage des formes HLA-G membranaires qui ne contiennent pas l'épitope codé par l'intron 4 et les protéines HLA-G5/-G6 produites à partir d'ARNm épissés de façon alternative qui contiennent l'intron 4.

Exemple 2 : Détection des HLA-G solubles dans les cellules circulantes des vaisseaux chorioniques provenant de placenta au stade du premier trimestre

L'anticorps monoclonal (5A6G7) décrit dans l'exemple 1, a permis d'étudier la répartition tissulaire des isoformes solubles d'HLA-G sur des coupes de tissus. Lors d'une analyse préliminaire, le tissu placentaire au stade du premier trimestre a été analysé.

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Tissus

Les tissus embryonnaires et fœtaux humains ont été analysés à partir de lamelles archivées provenant de grossesses extra-utérines, de fausses-couches et d'avortements à partir de fœtus anormaux (essentiellement trisomies 21 et 18). Le stade de développement de l'embryon est estimé sur la base de plusieurs critères anatomiques selon la classification de Carnegie (O'Rahilly et al., 1987). Au total, 19 embryons, 6 fœtus et 5 adultes ont été sélectionnés et un total de 56 tissus, ont été analysés par immunohistochimie comme illustré à la figure 4.

2.1.2 Anticorps monoclonaux

- L'anticorps 5A6G7 a été préparé comme précisé à l'exemple 1.
- L'anticorps 4H84 est un anticorps de référence qui reconnaît toutes les isoformes d'HLA-G.

- Les anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur CD71 de la transferrine (Laboratoires Novocastra, UK) ont été utilisé pour identifier les cellules érythroïdes.

5 - Les anticorps monoclonaux dirigés contre CD34 (Laboratoires Novocastra) et CD45 (Dako, FR) permettent de détecter les cellules progénitrices hématopoïétiques alors que seul l'anticorps monoclinal dirigé contre CD34 permet de reconnaître les cellules progénitrices endothéliales.

2.1.3. Cultures de cellules érythroïdes

Des cultures de cellules érythroïdes (1.10^5 cellules du sang de 10 cordon ombilical ou de cellules de moelle osseuse) sont étalées sur un milieu semi-solide contenant de la méthylcellulose, 10 % de MCL (milieu conditionné lymphocytaire) (Stem cell, Vancouver) et 2 U/ml d'EPO (Roche, FR). Ces cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂, pendant 14 jours.

La culture liquide à 2 phases est utilisée et est définie comme suit. 15 Sommairement, les cellules (du cordon ombilical par exemple) sont isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll 1077 (SIGMA), et mises en culture à une densité de 10^6 cellules/ml dans du milieu essentiel minimal alpha (α -MEM, Sigma) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (FCS, Sigma), 1 µg/ml de cyclosporine A (Novartis) et 10 % de milieu récupéré de cultures des lignées cellulaires de 20 carcinome de vessie 5637 négatives pour HLA-G (ATCC n° HTB-9). Les cultures sont incubées pendant 7 jours à 37°C, sous une atmosphère à 5 % de CO₂, dans de l'air avec 98 % d'humidité. Après cette culture de phase I, les cellules non-adhérentes sont récupérées, lavées, et ensemencées à une densité de $0,4 \times 10^6$ cellules/ml dans du α -MEM, 30 % FCS, 1% d'albumine sérique bovine, 10^{-5} M de β -mercaptopéthanol, 15 mM de L-glutamine, 10^{-6} M de dexaméthasone, et 1 U/ml d'érythropoïétine recombinante (Epo, Roche) pendant 5-6 jours (dénommée culture de phase II).

2.1.4. Analyse immunohistochimique

Des coupes de tissus déparaffinées sont soumises à un traitement de récupération d'épitope à haute température dans du tampon citrate de sodium à 10 30 mM (pH 6,0) en utilisant un appareil à micro-ondes du commerce pour optimiser l'immuno-réactivité. Des coupes de tissus ont été perméabilisées en utilisant du PBS 1X avec 0,1% de saponine et 10 mM de tampon Hépès. L'activité de la peroxydase

endogène est inhibée en traitant les coupes pendant 5 minutes à température ambiante avec 3% d'eau oxygénée dans de l'eau. La fixation non-spécifique est évitée par ajout de 50 mM de Tris, 3% de BSA (Sigma), 40% de sérum humain pendant 20 minutes avant coloration avec l'anticorps primaire pendant 30 minutes à température ambiante.

5 L'expression de la protéine HLA-G est ensuite évaluée sur une série de coupes tissulaires ou des cellules en utilisant le système de détection universel à la biotine UltraTech HRP (Immunotech, Coulter, France), selon les instructions du fabricant. L'analyse immunocytochimique de l'expression d'HLA-G par les cellules BFU-E est réalisée sur des cellules BFU-E cytocentrifugées, qui ont été récupérées à partir des
10 cultures en milieu semi-solide et lavées dans du PBS, avant la centrifugation.

2.2 Résultats

Comme le montre la figure 2a, les protéines HLA-G5 et HLA-G6 sont localisées dans les cellules de trophoblastes extravilleux. De plus et de façon surprenante, ces molécules HLA-G solubles ont été détectées par coloration à l'aide des anticorps monoclonaux 5A6G7 soit dans des cellules en contact étroit avec des vaisseaux bourgeonnants associés à des cytотrophoblastes, soit dans des cellules dépourvues d'axes villeux, ou soit dans des cellules situées dans la lumière de vaisseaux matures (Figures 2b et 2c). Cette nouvelle localisation cellulaire des HLA-G est confirmée en utilisant un autre anticorps anti-HLA-G, l'anticorps monoclonal 87G
20 de référence.

Afin d'identifier plus précisément ces cellules exprimant la protéine HLA-G, qui ressemblent morphologiquement à des érythroblastes, une analyse immunohistochimique a été réalisée sur une série de coupes de trophoblastes inclus dans de la paraffine provenant d'embryons de 32 jours par détection des marqueurs suivants :

- le récepteur de la transferrine CD71 : exprimé des érythroïdes (BFU-E, *burst-forming unit*) aux réticulocytes
- le CD34 : exprimé à la fois par les cellules progénitrices endothéliales et hématopoïétiques
- le CD45 : exprimé à partir des cellules progénitrices hématopoïétiques jusqu'aux cellules matures des lignées lymphoïdes et myéloïdes
- les protéines solubles HLA-G5 et HLA-G6.

Les résultats montrent que les isoformes solubles sont exprimées par toute la sous-population de cellules érythroïdes CD71⁺ alors que peu de cellules HLA-G⁺ co-expresent le marqueur de cellule souche CD34 (Figures 2b et 2c).

Au contraire, les cellules endothéliales des vaisseaux chorioniques matures sont CD34⁺, HLA-G⁻, CD71⁻ et CD45⁻ (Figure 2c).

Ces résultats permettent effectivement de conclure à la présence des isoformes solubles d'HLA-G dans les cellules hématopoïétiques appartenant à la lignée érythropoïétique.

Exemple 3 : Identification de l'isoforme soluble HLA-G5 dans les érythroblastes foetaux

Afin de caractériser l'isoforme soluble d'HLA-G présente dans les cellules érythroïdes fœtales, l'organe dans lequel les érythroblastes sont les constituants principaux, à savoir le foie qui est le producteur principal d'hématies dans le fœtus, a été utilisé.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Tissus et anticorps monoclonaux

Les protéines sont extraites du foie obtenu à partir de 2 embryons distincts respectivement de 9 et 12 semaines. Les tissus sur lesquels portent les analyses sont ceux décrits dans l'exemple 2.

L'anticorps monoclonal 5A6G7 décrit à l'exemple 1 est utilisé pour l'analyse immunohistochimique.

3.1.2 Analyse Western blot

Des foies fœtaux de 9 et 12 semaines ont été broyés et lysés dans 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40 (Sigma) contenant des inhibiteurs de protéase et du tampon froid pendant 1 heure. Les lysats de cellules transfectées par M8-HLA-G5 et M8-pcDNA étaient utilisés comme respectivement témoins positif et négatif envers HLA-G5. Après centrifugation à 15 000g à 4°C pendant 30 minutes, les surnageants étaient supplémentés par du tampon Leamml 6X. Les échantillons sont chauffés pendant 10 minutes à 95°C avant d'être chargés sur un gel SDS-PAGE à 12%. Les protéines sont alors électro-transférées sur une membrane en nitrocellulose (Hybond-C extra). La membrane est ensuite traitée contre les liaisons non-spécifiques par 5% de lait lyophilisé écrémé dans du PBS contenant 0,2% de

Tween 20 (PBST) pendant une nuit à 4°C. Après lavage dans du PBST, la membrane est incubée avec des anticorps anti-souris conjugué à HRP pendant 30 minutes à température ambiante et lavée dans du PBST. Les protéines HLA-G sont détectées par chimio-luminescence (ECL Plus Kit) (Menier et al., *Hum. Immunol.*, 2003, 64, 315-5 326).

3.2 Résultats

Par analyse *Western blot* en utilisant l'anticorps monoclonal 5A6G7, une protéine de 37 kDa, qui correspond au poids moléculaire de la chaîne lourde de HLA-G5 (Figure 3) est identifiée. Les transfectants M8-pcDNA et M8-HLA-G5 sont 10 utilisés respectivement comme témoins positif et négatif envers HLA-G5. Ce résultat montre que l'isoforme soluble d' HLA-G détectée dans les érythroblastes fœtaux est l'isoforme HLA-G5. En accord avec ce résultat, une analyse immunohistochimique a permis de détecter de nombreuses cellules HLA-G⁺ (incubation avec l'anticorps monoclonal 5A6G7) dans du tissu hépatique fœtal inclus dans de la paraffine, comme 15 détaillé dans l'exemple suivant.

Exemple 4 : Répartition de l'isoforme soluble HLA-G5 à tous les organes hématopoïétiques embryonnaires et fœtaux

La répartition de l'isoforme soluble HLA-G5 dans tous les organes hématopoïétiques embryonnaires et fœtaux a été analysée en réalisant des expériences 20 immunohistochimiques sur des coupes d'embryons et de tissu fœtal inclus dans de la paraffine, à l'aide des anticorps monoclonaux dirigés contre HLA-G5, CD71, CD34 ou CD45.

4.1 Matériels et méthodes

Les tissus analysés proviennent d'organes hématopoïétiques 25 embryonnaires et fœtaux tels que décrits dans l'Exemple 2.

Les anticorps monoclonaux dirigés contre HLA-G5 (5A6G7) et les marqueurs CD71, CD34 et CD45 de l'exemple 1 ont été utilisés dans les conditions précisées à l'exemple 2.

4.2 Résultats

On observe la co-localisation d'HLA-G et du récepteur CD71 dans tous les organes hématopoïétiques embryonnaires et fœtaux : la vésicule vitelline, la splanchnopleure para-aortique/Aorta-Gonado-Mesonephros (SpP/AGM), le foie, la rate et la moelle osseuse ; ces résultats confirment que les cellules HLA-G⁺ sont des érythroblastes.

	CD71	CD34	HLA-G	CD45
Cellules érythroïdes				
Vésicule vitelline	+	-	+	-
pSp/AGM	+	-	+	-
foie fœtal	+	-	+	-
rate	+	-	+	-
moelle osseuse	+	-	+	-

Ces résultats montrent que les cellules HLA-G⁺ expriment également le récepteur CD71 et cette co-localisation existe pendant toute la durée du développement embryonnaire et fœtal : dans la vésicule vitelline, dans l'embryon de 10 16 jours, dans tous les organes hématopoïétiques d'un embryon de 32 jours, dans le foie de 12, 34 et 36 semaines, dans la moelle osseuse de 12, 14 et 16 semaines), ainsi que dans la moelle osseuse chez l'adulte. Elles sont donc bien un marqueur de la lignée érythroïde.

Ces résultats illustrent donc le rôle de l'isoforme soluble d'HLA-G dans l'érythropoïèse en tant que marqueur dans la différenciation de la lignée érythroïde.

Par ailleurs, ces résultats montrent qu'aucune cellule souche hématopoïétique CD34+ n'est présente dans la vésicule vitelline d'un embryon de 16 jours contrairement aux cellules souches érythroïdes CD71⁺.

En effet, les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺, CD45⁺ sont toutes HLA-G⁻.

Ceci montre que HLA-G n'intervient pas sur les cellules souches multipotentes.

Exemple 5 : Les érythroblastes sanguins du cordon ombilical expriment HLA-G5

Pour déterminer si l'isoforme HLA-G5 est produite directement par les érythroblastes ou bien fixée à la surface cellulaire de l'érythroblaste par l'intermédiaire de récepteurs HLA-G spécifiques, après sa production par d'autres cellules, le sang du cordon ombilical a été choisi comme source d'érythroblastes.

5.1 Matériels et méthodes**5.1.1 Tissus**

Les unités de sang de cordon ombilical (p/CB) ont été obtenues lors d'accouchements à terme normaux, après le consentement éclairé des mères, à l'Unité Obstétrique de l'Hôpital Robert Debré, à Paris (France).

5.1.2 Essais de cellules formant des colonies d'érythroïdes (BFU-E) en milieu semi-solide

voir exemple 2, chapitre cultures de cellules érythroïdes.

5.1.3 Maturation de cellules progénitrices dans la culture liquide à 2**15 phases**

Voir exemple 2, chapitre cultures de cellules érythroïdes.

La concentration en HLA-G5 dans les surnageants est évaluée par un ELISA qui mesure spécifiquement les HLA-G5/-G6.

5.1.4 Test ELISA

Les concentrations en HLA-G5 sont mesurées dans des surnageants de cultures liquides à deux phases à la fin des phases I et II (méthode de type « sandwich »). Des plaques de microtitration de 96 puits (Corning Costar, France) sont recouvertes d'anticorps monoclonaux 5A6G7. Après 5 lavages dans du tampon phosphate salé (PBS) contenant 0,2% de Tween 20 et 0,1% d'albumine sérique de veau (BSA, Sigma), les plaques sont saturées en PBS contenant 1% de BSA et 0,1% de Tween 20 pendant 2 heures à 37°C. Après 5 lavages dans du PBS avec 0,2% de Tween 20, 100 µl d'échantillon est ajouté dans chaque puits et testé en duplicitat. Après incubation pendant 1 heure à 37°C, les boites sont lavées 5 fois dans du PBST (Phosphate Buffer Saline Tween). L'anticorps de détection, un anticorps monoclonal W6/32 biotinylé (Leinco Technologies Inc., Ballwin) reconnaissant un déterminant monomorphique des chaînes lourdes de HLA de classe I associées à la microglobuline B2, préalablement dilué 1/250, a été incubé pendant 1 heure à 37°C. Après lavage dans

du PBST, la révélation est réalisée par incubation dans de la streptavidine AMDEX™ conjuguée à la peroxydase de raifort (Amersham) pendant 1 heure à 37°C, puis avec du substrat TMB (3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine, Sigma) à température ambiante. La réaction est stoppée par l'ajout d'HCl 1N. Les densités optiques sont mesurées à 5 450 nm. Les courbes d'étalonnage sont réalisées en utilisant des dilutions en série d'HLA-G5 soluble recombinante purifiée. La concentration en HLA-G5 est déterminée à partir de la valeur de densité optique selon la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés comme les moyennes du duplicate. La limite de détection par test ELISA est de 5 ng/ml.

10 5.2 Résultats

Quelle que soit le stade de la culture, c'est à dire à partir de la cellule la plus primitive (BFU-E) jusqu'à la cellule érythroïde la plus différenciée (réticulocyte), la concentration en HLA-G5 est comprise entre 25,5 ng/ml et 44,3 ng/ml. Une analyse immunocytochimique des cellules correspondantes confirme que 15 la culture liquide à deux phases permet la différenciation des cellules érythroïdes qui sont positives pour le CD71 et co-expiment le CD36 (récepteur à la thrombospondine et marqueur pour identifier les stades CFU-E et érythroblastes de la lignée érythroïde) à J=7 de la seconde phase de culture. D'après ces résultats, on peut donc en conclure que les molécules HLA-G5 détectées par ELISA dans des surnageants de culture 20 étaient bien produites par les cellules érythroïdes au cours de leur différenciation.

Exemple 6 : Les érythroblastes de la moelle osseuse adulte expriment HLA-G5

Le maintien de l'expression de l'isoforme HLA-G5 dans la lignée érythropoïétique au cours de la vie chez l'adulte a été étudié. Etant donné que l'hématopoïèse est localisée dans la moelle osseuse chez l'adulte, les cellules BFU-E 25 ont été collectées à partir de culture semi-solide de cellules progénitrices hématopoïétiques de moelle osseuse (voir exemple 2).

6.1 Matériels et méthodes

6.1.1. Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés pour détecter les 30 HLA-G :

- 4H84 est dirigé contre le peptide 61-83 du domaine a1 de HLA-G et reconnaît la chaîne lourde de HLA-G libre ;

- MEM-G/09 (Exbio, Praha, République Tchèque).

Tous ces anticorps réagissent avec une molécule de HLA-G associée à β2m correctement repliée.

6.1.3 Méthodes

5 La technique de culture des cellules BFU-E en milieu semi-solide et l'analyse immunochimique ont été utilisées telles que décrites à l'exemple 2.

6.2 Résultats

L'isoforme soluble HLA-G5 est détectée dans les cellules BFU-E par analyse immunocytochimique en utilisant plusieurs anticorps monoclonaux anti-HLA-G tels que 5A6G7, MEM-G/9, et 4H84. En outre, lors d'une analyse immunochimique sur des coupes d'os inclus dans de la paraffine, HLA-G5 est alors localisée dans les érythroblastes à partir de moelle osseuse d'adulte.

Exemple 7 : Expression de l'isoforme soluble d'HLA-G par les cellules endothéliales embryonnaires

15 L'isoforme soluble d'HLA-G est aussi identifiée dans les cellules endothéliales dans les vaisseaux bourgeonnants à deux endroits : dans le cœur mésenchymal des villosités chorioniques et dans la partie juxta-allantoïde de la vésicule vitelline de l'embryon précoce.

Dans chaque cas, l'isoforme HLA-G co-localise avec le marqueur
20 CD34.

La présence de l'isoforme soluble d'HLA-G dans les cellules endothéliales des vaisseaux bourgeonnants de villosité chorioniques et de la partie juxta-allantoïde de la vésicule vitelline montre son implication dans le processus angiogénique.

Exemple 8 : Effet d'HLA-G5 sur la différenciation érythroïde

L'effet d'HLA-G5 sur la différenciation érythroïde a été analysée sur une lignée érythroleucémique (K562, ATCC) exprimant ou non HLA-G5, à savoir : une lignée K562 transfectée avec un plasmide d'expression d'HLA-G5 et sécrétant HLA-G5 (K562-pcDNA-HLA-G5) et à titre de contrôle, une lignée K562 transfectée par le vecteur vide (K562-pcDNA).

L'expression des marqueurs de différenciation glycophorine A (GPA) et CD36 qui apparaissent aux dernières étapes de la différenciation érythroïde

(érythroblaste, réticulocyte, globule rouge mature) a été analysée, en cytométrie de flux à l'aide d'anticorps commerciaux dirigés contre ces marqueurs. Les résultats sont illustrés ci-après :

Cellules	GPA	CD36
K562-pcDNA-HLA-G5	40 % (16)*	77 % (15)
K562-pcDNA	22 % (8,7)	55 % (10)

* les valeurs entre parenthèse correspondent à l'intensité moyenne de fluorescence.

5 Les résultats d'immunomarquage montrent que la lignée sécrétant HLA-G5 est constituée par un nombre plus important de cellules érythroïdes matures, lesquelles expriment en plus grande quantité des marqueurs de différenciation érythrocytaire.

10 L'effet d'HLA-G5 sur la différenciation érythroïde est confirmé par des expériences de co-culture entre les deux lignées, afin de vérifier que la forme HLA-G5 sécrétée par K562-pcDNA-HLA-G5 induit la différenciation de la lignée K562-pcDNA.

15 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'au moins une isoforme soluble d'HLA-G, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies de la circulation du sang.

5 2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites pathologies sont sélectionnées dans le groupe constitué par les anémies et les ischémies.

10 3°) Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ladite isoforme soluble d'HLA-G est sous la forme d'une composition comprenant en outre au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

4°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite composition est sous forme liquide.

15 5°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite composition est sous forme solide.

6°) Procédé de détection et éventuellement de tri de cellules des lignées érythrocytaires et endothéliales selon leur stade de différenciation, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 a) la mise en contact de l'échantillon biologique à tester avec des anticorps dirigés contre les marqueurs suivants : isoforme soluble d'HLA-G, CD71, CD34 et CD45, et

b) la détection et éventuellement le tri de cellules correspondant à différents stades de différenciation des lignées érythrocytaires ou endothéliales, en fonction de leur profil d'expression des marqueurs définis en a).

25 7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) la mise en contact de l'échantillon biologique à tester, avec un panel d'anticorps sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps dirigés contre les marqueurs suivants : isoforme soluble d'HLA-G, CD71, CD34 et CD45,

30 a') la sélection des cellules exprimant l'isoforme soluble d'HLA-G, et

c) la détection du type de cellules à l'aide du marqueur CD71.

8°) Procédé de détection selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est sélectionné dans le groupe constitué par un échantillon de sang ou un échantillon de moelle osseuse.

9°) Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications 5 6 à 8, caractérisé en ce que préalablement à l'étape a), les cellules dudit échantillon biologique sont perméabilisées.

S263PCT101.ST25.
SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

MENIER, Catherine

ROUAS-FREISSL, Nathalie

CAROSELLA, Edgardo, D.

<120> Utilisation de compositions contenant une forme soluble d'HLA-G dans le traitement de pathologies du sang.

<130> F263PCT101

<150> F 0307871

<151> 2003-06-30

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<220>

<223> HLA-G5/-G6

<400> 1

Ser Lys Glu Gly Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser
1 5 10 15

Leu Ser Glu Asp Leu
20

1/4

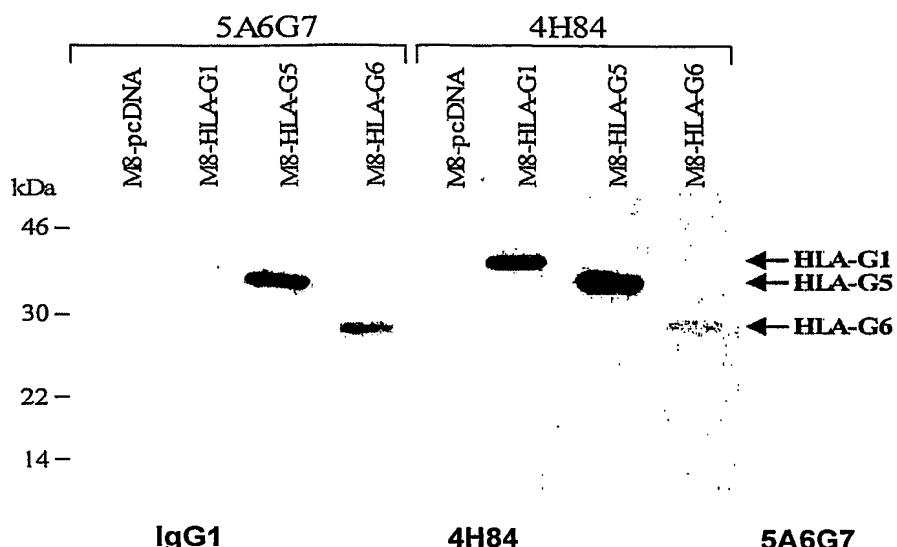
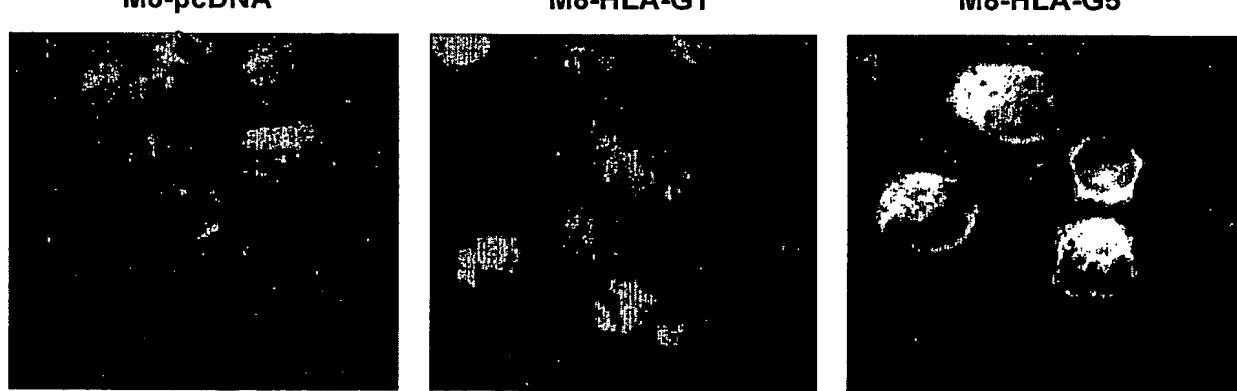
A**B****C**

FIGURE 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

BEST AVAILABLE COPY

2 / 4

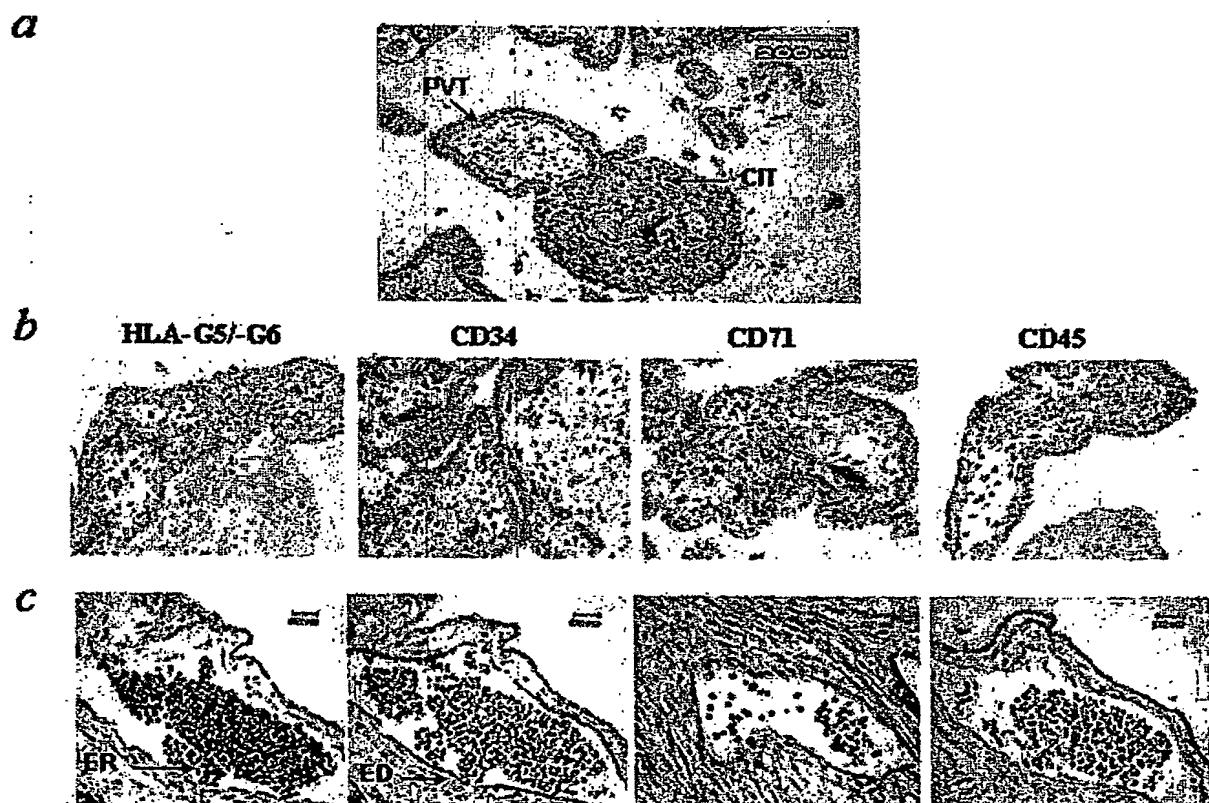


FIGURE 2

BEST AVAILABLE COPY

3 / 4

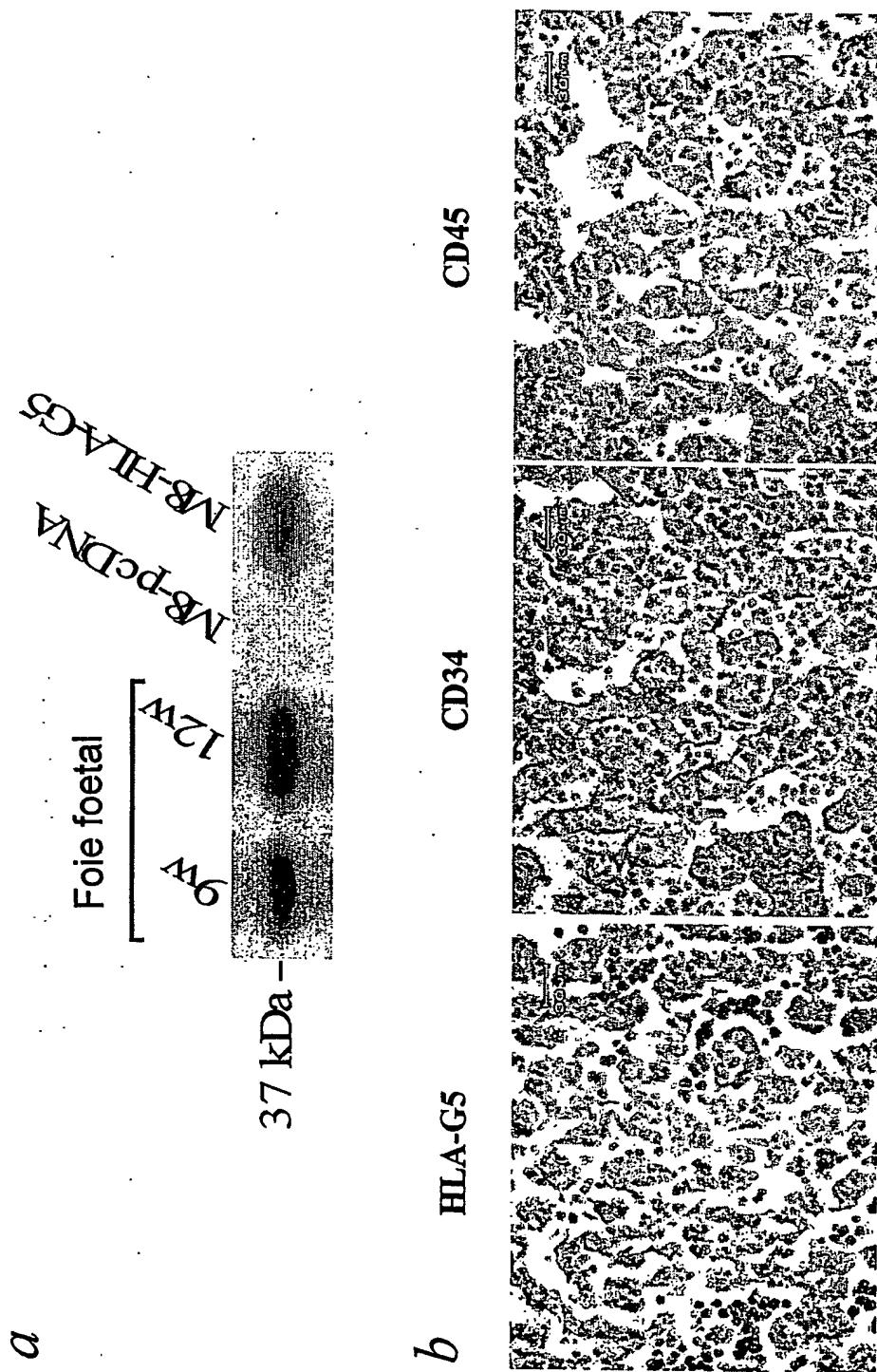


FIGURE 3

BEST AVAILABLE COPY

4/4

Embryon *	Age (jours)	Nombre de somites	Longueur (mm)	Nombre d'échantillons	Nombre et type de tissus
7 *	16	0		2	2 YS
10	22-23	4-12	2.5	3	3 YS, 2 PV
11	24-25	13-20	2.5	1	1 E, 1 YS, 1 PV
12	26-27	21-29	4	3	2 E, 1 YS, 3 PV
13	28-30	30-35	4.5	3	1 E, 1 YS, 3 PV
14	31-32	**	4	2	2 E, 1 YS, 2 PV
16	38-40		6-8	1	1 E, 1 YS, 1 PV
17	41-43		11-12	2	1 E, 1 YS, 1 PV
19	48-49		15-17	1	1 E, 1 PV
20	50-51		18-23	1	1 E, 1 PV
Foetus	13 semaines			1	L, S, BM
	15			1	L, S, BM
	16			1	L, S, BM
	26			1	L, S, BM
	34			1	L, S, BM
Enfant	2 ans			1	BM
	5			1	BM
Adulte	40			1	BM
	67			1	BM
	82			1	BM

** A partir de ce stade, le nombre de somites est difficile à déterminer et n'est donc pas un critère utile.

* Stade de développement selon la classification de Carnegie.

PV : villosité placentaire

YS : vésicule vitelline (« Yolk Sac »)

E : embryon

L : foie (« liver »)

S : rate (« spleen »)

BM : moelle osseuse (« bone marrow »)

FIGURE 4